

新殺菌剤ジエトフェンカルブの 開発 — 負相関交差耐性の応用 —

藤村 真 宝塚総合研究所 農業科学研究所 副主任研究員
高橋 淳也 宝塚総合研究所 農業科学研究所 主任研究員
大石 敏朗 三沢工場 技術部 部長補佐
堀出 文男 (株)アグロス 生産部 部長補佐
原 正樹 生物環境科学研究所 主任研究員
南部 健二 生物環境科学研究所 主任研究員

Diethofencarb : A New Fungicide Coping with Fungicide Resistance

Makoto FUJIMURA (Takarazuka Research Center,
Agricultural Science Research
Lab.)

Junya TAKAHASHI (Takarazuka Research Center,
Agricultural Science Research
Lab.)

Toshiro OISHI (Misawa Works, Technical Dept.)

Fumio HORIDE (Agros Corporation, Production Dept.)

Masaki HARA (Environmental Health Science Lab.)

Kenji NAMBU (Environmental Health Science Lab.)

Diethofencarb (isopropyl *N*-(3,4-diethoxyphenyl) carbamate) is a new fungicide which controls effectively gray mold caused by benzimidazole-resistant *Botrytis cinerea*. The fungicide is systemic in plants and curative as well as preventive in controlling gray mold.

In practical fields, the fungicide is used as combinations with thiophanate-methyl (Getter[®]), carbendazim (Sumico[®]) or procymidone (Sumiblend[®]). These combinations perform excellent and consistent activity against gray mold disease even in the fields where efficacy of thiophanate-methyl, carbendazim or procymidone is decreased by widespread of resistance.

はじめに

農業用殺菌剤に対する薬剤耐性の発達は1970年代より次々と報告されるようになった^{1)~3)}。これは1960年以降に開発されて来た特異的作用点を持ち選択的効力を示す殺菌剤の使用増加と時を同じくしている⁴⁾。これらの薬剤はそれまで多く使用されていた各部位に作用して抗菌活性を示す非選択的な殺菌剤とは異なり、低用量で安定した効力を有することを特徴としていた。しかし、この選択的殺菌剤はこれを繰り返し使用すると薬剤耐性が出現し効力の低減を来すという欠点がある。これは非選択的殺菌剤が多作用点阻害であるために作用点の変化による耐性化が起こりにくいに対し、選択的殺菌剤では作用点の変異が耐性の獲得を容易にする可能性が大きいとされている⁵⁾。

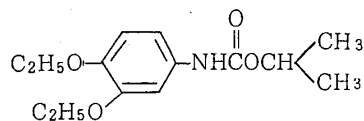
実圃場で薬剤耐性菌の発達を回避、遅延する方法とし

て作用性の異なる2種以上の殺菌剤を混合または交互に使用する方法、生物的、物理的防除法を組み入れた総合防除法等が有効とされているが、耐性菌が発達した場合にこれを積極的に打破する方法の一つとして負相関交差耐性の利用をあげることが出来る。負相関交差耐性とはある薬剤に耐性が発達するのに伴って他の薬剤に対する感受性が増大する現象を云う⁶⁾。負相関交差耐性を利用して耐性菌を防除するという考え方は De Waard

一般名：ジエトフェンカルブ
(diethofencarb)

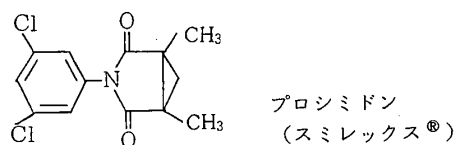
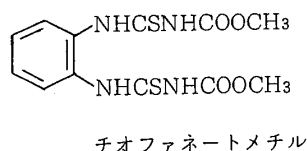
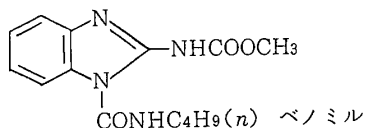
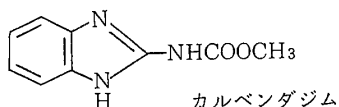
商品名：パウミル[®] (Powmyl)

試験名：S-1605, S-165



(1984)によってその具体例をあげて示されていたが、いずれも実験的なレベルに留まり、実用的な利用までは隔たりがあるとされていた⁷⁾。ベンズイミダゾール耐性灰色かび病防除剤として当社で開発上市されたジェットフェンカルブ(イソプロピル*N*-(3,4-ジエトキシフェニル)カーバメート)はこの負相関交差耐性という現象を利用して実用化に成功した世界初の殺菌剤である。

カルベンダジム、ベノミル、チオファネートメチルで代表されるベンズイミダゾール系殺菌剤は広スペクトルの殺菌剤であり、灰色かび病防除剤としても長年使用されて来たが耐性菌の出現により効力の大幅低下を来していた。当社剤スミレックス[®]はこのベンズイミダゾール



ル系殺菌剤に替わる灰色かび病防除の特効薬として、海外では1977年に、国内では1981年にそれぞれ上市された。しかし、このスミレックス[®]にも耐性灰色かび病菌の出現が懸念されるようになり、果樹、そ菜の灰色かび病耐性菌の防除対策はわが国のみならず、世界的に緊急の課題となっていた。特に当社にとってはスミレックス[®]の耐性菌の出現に対する早期対策を立てることの必要性をせまられていた。このような状況の中で、ベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌がバーバン等のカーバメート系除草剤に負相関交差耐性を示すという現象に着目して、この負相関交差耐性を利用した新しい薬剤創製の可能性を追求した。鋭意この系統の化合物誘導体の合成が行われ、効力、性能に加え安全性の面から検討が加えられ、最適化合物としてジェットフェンカルブを選択し

住友化学 1993-I

た。工業的製法検討が開始され、安全性、環境評価試験も継続検討された。

実用性評価については1983年より国内外で精力的な開発試験が行なわれ、1987年フランスにて仮登録を取得、国内では1990年11月に登録を取得し販売が開始された。

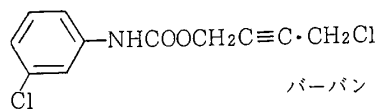
ここではジェットフェンカルブの研究開発の経緯、構造活性相関、生物効果における作用特性、作用機構、圃場試験、製剤、毒性、動植物代謝、環境挙動などについて紹介する。

スクリーニング研究の経緯

1. 研究の背景と着想

ベンズイミダゾール系殺菌剤は様々な病害に対し高い防除活性を示すことから広スペクトル殺菌剤として広く使用されている。しかし、耐性菌の出現はベンズイミダゾール系殺菌剤による病害防除上の深刻な問題となっている³⁾。特にブドウや各種そ菜に多犯性を示す灰色かび病(*Botrytis cinerea*)の場合には、大量の胞子を病斑に形成し、風媒により容易に伝搬するため耐性菌の広がり著しい。我国においては、1980年既に野菜の施設栽培が普及したが、そこでの果菜類の促成栽培では耐性菌問題は深刻となった^{8~10)}。ベンズイミダゾール耐性の灰色かび病菌は薬剤の使用を中止してもその耐性の菌密度の低下が遅く数回薬剤散布を行うと容易に耐性菌が回復し、高密度に達することが知られている。このような状況のもとでベンズイミダゾールと作用機構の異なる殺菌剤として、当社のスミレックス[®](プロシミドン)に代表されるジカルボキシイミド系殺菌剤が開発され、ベンズイミダゾール系殺菌剤に替わる灰色かび病防除剤としてその役割を果たしてきた。しかしながら、このジカルボキシイミド系殺菌剤に対する耐性菌が比較的早期に実圃場で分離されその顕在化の兆候が懸念されるようになりその対応が急がれる状況となった¹¹⁾。

このような状況のもとで農業科学研究所ではベンズイミダゾール耐性菌が*N*-フェニルカーバメート系除草剤に負相関交差耐性を示すという Leroux らの知見に興味をもった。これは *in vitro* の抗菌試験でバーバンのような*N*-フェニルカーバメート系除草剤がベンズイミダゾール耐性菌に対し弱いながら抗菌活性を示すが、感受性菌(野生菌)にはほとんど抗菌活性を持たないという現象である^{12,13)}。バーバンを用いてシャーレ試



験によるベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌に対する抗菌活性を確認し、さらに、すでに日本各地で採取していたベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌108株すべてに対する抗菌活性を確認した。この結果からバーバンの抗菌活性はある特定の耐性菌にだけ特異的にみられる活性ではなく、耐性菌に対して普遍性のある活性であることが推測された。従って、もしバーバンの持つ除草活性と抗菌活性とがお互いに独立した生理活性であって従属した生理活性でなければ、構造の変換によって薬害としての除草活性を軽減し、抗菌活性を増大することの可能性が予測された。これらの考えをもとに、*N*-フェニルカーバメート類に関してベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌防除剤の本格的スクリーニング研究が開始された。

さらに当社剤スミレックス®（ジカルボキシイミド系殺菌剤）の耐性灰色かび病菌のほとんどがベンズイミダゾール系殺菌剤に対して同時耐性であって、*N*-フェニルカーバメート化合物はこのスミレックス耐性灰色かび病害に対しても実用上防除効果を有することが明らかとなり、スクリーニング研究への期待は一層増大した。

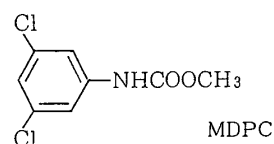
2. 化学構造と殺菌活性

スクリーニングの初期目標は殺菌活性と除草活性とを分離し、除草活性に由来する薬害のない殺菌活性のみを有する化合物の選出であった。過去に合成されたカーバメート化合物を含め、除草活性を軽減する方向でスクリーニングを行い、弱いながら目的とする殺菌活性のみを有する化合物を数点見出した。その中で、メチル*N*-(3,5-ジクロロフェニル)カーバメート（MDPC）は耐性灰色かび病菌に対する抗菌活性がペノミルの感受性

菌に対する抗菌活性の1/5と絶対効力は低いものの（第1図）、キュウリを用いたポット試験（*in vivo* 試験）において200ppm処理で耐性灰色かび病に対し予防的防除効果を示した（第1表）¹⁴。さらにMDPCはキュウリポット試験による病斑の進展を阻止する治療効果、キュ

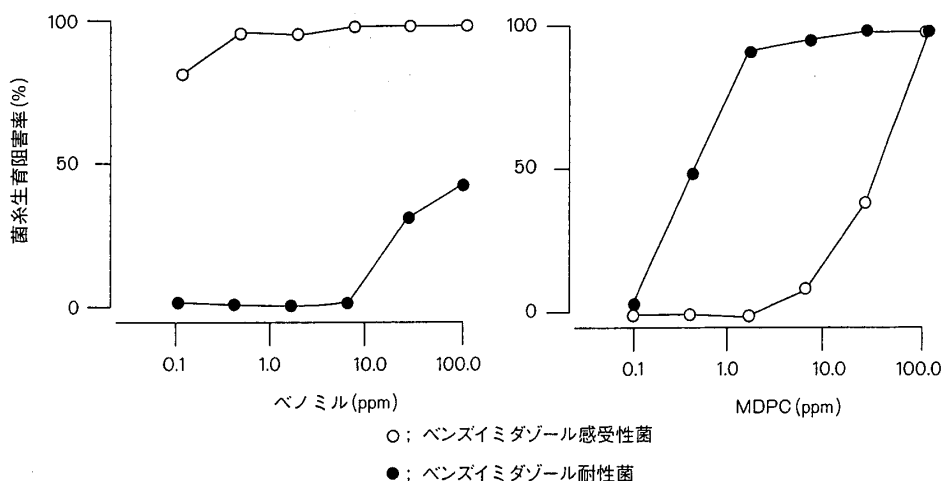
第1表 ベンズイミダゾール耐性キュウリ灰色かび病に対するMDPCの防除効果

濃度 (ppm)	防 除 効 果 (%)		
	予 防	治 療	浸 透 移 行 性
200	95	71	—
50	59	57	98
12.5	12	0	88
3.1	—	—	85



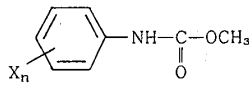
ウリの根部に処理して茎葉部の罹病を阻止する浸透性効果を有し、MDPCが殺菌剤として基本的に優れた性質を有することが明らかになった（第1表）¹⁴。このような結果を踏まえMDPCの性質をさらに高める方向で誘導体の合成、スクリーニング研究が進められた^{15~74}。ベンゼン環の置換基、カーバメート部位、アルコール部位のそれぞれの構造修飾の結果から次のことが云える⁷⁵。

第2表、第3表、第4表に示されるように、ベンゼン環置換基については3,5-位にクロロ原子、ブromo原子、



第1図 ベンズイミダゾール耐性菌に対するMDPCの抗菌活性

第2表 メチルN-フェニルカーバメート類の構造とベンズイミダゾール耐性灰色かび病防除活性

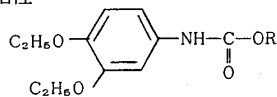


X _n	防除効果 ^{a)}	
	200	50 (ppm)
H	0	0
2-Cl	0	0
3-Cl	0	0
3-CH ₃	0	0
3-OCH ₃	0	0
3-OC ₂ H ₅	0	0
4-Cl	0	0
3,4-Cl ₂	0	0
3,4-(CH ₃) ₂	0	0
3,4-(OCH ₃) ₂	0	0
3,4-(OC ₂ H ₅) ₂	4	4
3,5-Cl ₂ ^{b)}	5	3
3,5-Br ₂	5	3
3,5-(CH ₃) ₂	5	3
3,5-(OCH ₃) ₂	4	2
2,3,5-Cl ₃	0	0
3,4,5-Cl ₃	0	0

a) 6段階評価 0 ; 25%以下, 1 ; 26-49%, 2 ; 50-69%
3 ; 70-89%, 4 ; 90-99%, 5 ; 100%

b) MDPC

第3表 N-(3,4-ジエトキシフェニル)カーバメート類の構造とベンズイミダゾール耐性灰色かび病防除活性



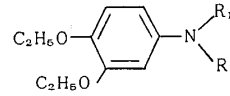
R	防除活性 ^{a)}		
	200	50	12.5 (ppm)
CH ₃	4	4	0
C ₂ H ₅	5	4	3
n-C ₃ H ₇	5	4	0
i-C ₃ H ₇ ^{b)}	5	5	5
n-C ₄ H ₉	4	0	—
i-C ₄ H ₉	1	0	—
s-C ₄ H ₉	5	5	3
t-C ₄ H ₉	0	0	0
CH(CH ₃)C ₃ H ₇ (n)	5	5	5
CH ₂ CH ₂ Cl	5	4	2
CH(CH ₂ F) ₂	5	5	5
CH(CH ₂ Br) ₂	5	5	4
CH ₂ CH=CH ₂	5	5	1
CH ₂ C≡CH	5	5	4

a) 6段階評価 0 ; 25%以下, 1 ; 26-49%, 2 ; 50-69%
3 ; 70-89%, 4 ; 90-99%, 5 ; 100%

b) ジエトフェンカルブ

メチル基を導入した場合に高い活性が得られる。3,4-位にジエトキシ基を導入した場合にも活性が高く、アルコール部位がイソプロピル基、sec-ブチル基、1-メチルブチル基ではメチル基の場合よりも大幅な活性の増

第4表 ジエトフェンカルブ関連化合物の構造とベンズイミダゾール耐性灰色かび病防除活性



R ₁	R ₂	防除効果 ^{a)}		
		200	50	12.5 (ppm)
H	COOC ₂ H ₅	5	4	3
H	COOC ₃ H ₇ (i) ^{b)}	5	5	5
H	CSOC ₂ H ₅	5	3	0
H	COSOC ₃ H ₇ (i)	5	5	3
H	CSSC ₃ H ₇ (i)	4	2	0
H	CONHCH ₃	0	0	0
H	CONHC ₃ H ₇ (i)	0	0	0
H	COC ₂ H ₅	0	0	0
H	COC ₄ H ₉ (i)	0	0	0
COCH ₃	COOC ₃ H ₇ (i)	5	4	4
COC ₆ H ₅	COOC ₃ H ₇ (i)	5	4	4
CH ₃	COOC ₃ H ₇ (i)	3	2	0

a) 6段階評価 0 ; 25%以下, 1 ; 26-49%, 2 ; 50-69%
3 ; 70-89%, 4 ; 90-99%, 5 ; 100%

b) ジエトフェンカルブ

大がみられる。アルコール部位については、さらにエチル基、イソプロピル基のβ位にハロゲン原子を導入しても高活性は維持され、アリル基、プロパルギル基も高活性を示した。カーバメート部位の変化についてはいずれも好結果は得られていない。チオカーバメート類は対応するカーバメート類より低い活性を示した。ジチオカーバメートではさらに活性が低下した。ウレア、アニライドの構造では活性を示さなかった。カーバメートの窒素原子をアセチル化、ベンズイル化した場合、活性はいずれも若干低下し、メチル化した場合活性は著しく低下した。

N-フェニルカーバメート類の構造と活性との関係をより詳細に検討した Hansch-Fujita 法による定量的構造活性相関解析で、寒天培地上での抗菌活性と構造との関係を解析し、ベンゼン環置換基の効果について(1)式を得た⁷⁶⁾。

$$\begin{aligned}
 \text{pI}_{50} = & 1.075 \sum \pi_{o,m} + 0.632 \pi p + 0.590 B_{\pi}^{\pi} - 0.087 (B_{\pi}^{\pi})^2 \\
 & (0.158) \quad (0.243) \quad (0.323) \quad (0.058) \\
 & + 0.379 B_{\pi}^{\pi} + 0.295 \text{HB}p + 2.363 \quad \dots (1) \\
 & (0.207) \quad (0.212) \quad (0.379)
 \end{aligned}$$

$$n=69, s=0.346, r=0.942$$

上記の解析結果から次のことが云える。活性に置換基の疎水性の効果(π)が大きく関与し、オルト位、メタ位の疎水性効果は加成性が成り立ち且つ位置特異的である。作用部位の受容体と置換基との相互作用はオルト、メタ位の置換基が大きく、パラ位ではオルト、メタ位に

比較して小さい。さらに、メタ位の置換基については立体的な効果が活性に関与し、置換基の最大幅 (B_5) が 3.40\AA の時に活性が最大になる。 B_5 の値 3.36\AA のエトキシ基が最も近い置換基である。また、 HB_p の係数がプラスであることは、メトキシ基、エトキシ基、ニトロ基、シアノ基などのパラ位置置換基が水素結合能によって活性の増加することを示している。

エステル部位置換基の抗菌活性に及ぼす効果を定量的に解析した結果として、 N -(3,4-ジエトキシフェニル)カーバメート類のエステル部位の変化について、(2)式が得られている⁷⁷⁾。

$$pI_{50} = 0.428 \log P - 0.180 (B_5)^2 + 1.592 B_5 - 1.441 I_\beta + 2.307 \quad \dots\dots(2)$$

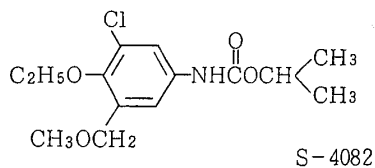
(0.237) (0.088) (0.768) (0.371) (1.731)

$n=29, s=0.275, r=0.876$

上記の解析結果から、エステル部位の疎水性 ($\log P$) が大きいほど活性は大きくなる傾向にあるが、その係数 0.428 の値から疎水性効果はそれほど大きくはないと思われる。さらに、置換基の立体的効果が活性に関与し、置換基の最大幅 (B_5) が 4.42\AA の時に最大活性を示す。 iso -ブチル基がこれに相当する。擬変数 I_β の係数が -1.44 と大きな値を示していることは β 位の分岐によって活性が $1/30$ になることを意味している。 β 位の分岐は活性には好ましくない。 α 位の3級分岐も同様である。

3. 高活性化合物の創製とジエトフェンカルブの選択

N -フェニルカーバメート類のスクリーニング研究の結果ベンズイミダゾール耐性菌に対して極めて高い効力を有する一群の化合物を見出すことに成功した。まず、ジ置換体については3,4-ジエトキシ置換体に高活性が得られたが、この3,4-ジエトキシ置換体の5位にメチル基、クロロ原子を導入することにより、さらに活性の向上がみられた。3-クロロ、4-エトキシ、5-メトキシメチル置換体 (S-4082) は代表的な化合物である。



しかし、S-4082を含む高活性の3,4,5-トリ置換フェニル誘導体はいずれも変異原性試験で陽性であり、その加水分解代謝物のアニリン誘導体も変異原性試験で陽性

であることから芳香族アミンの発癌性、変異原性の危険性を考慮して、開発化合物としては安全性を重視し、効力的にはやや劣るが実用場面では十分な効力を有し、変異原性の陰性であるジエトフェンカルブを選択した。

病害防除作用

1. 抗菌活性

第5表に示すようにジエトフェンカルブはベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌に特異的に高い抗菌活性を示す。ベンズイミダゾール系殺菌剤のカルベンダジムはベンズイミダゾール感受性菌の生育を 0.05ppm の濃度 (ED_{50} 値) で阻害するのに対し、耐性菌の場合に、 100ppm の濃度でもほとんど抗菌活性が認められなかった⁷⁸⁾。

第5表 灰色かび病菌に対する抗菌活性 (ED_{50} , ppm)

供試薬剤	ベンズイミダゾール感受性菌	ベンズイミダゾール耐性菌
ジエトフェンカルブ	>100	0.04
カルベンダジム	0.05	>100

一方、ジエトフェンカルブはベンズイミダゾール耐性菌の生育を 0.04ppm の濃度 (ED_{50} 値) で抑制した。従ってジエトフェンカルブ及びカルベンダジムの感受性菌及び耐性菌に対する抗菌活性にはそれぞれ1000倍以上の差が認められ、両剤間には極めて明確な負相関交差耐性が認められる⁷⁸⁾。なお、ジエトフェンカルブはベンズイミダゾール、ジカルボキシイミド複合耐性菌には強い抗菌活性を示したが、ジカルボキシイミド耐性菌の中でわずかに存在するジカルボキシイミドのみに耐性を示す菌には抗菌活性を示さなかった。

2. 防除作用と作用特性

ベンズイミダゾール耐性菌を用いた試験において、ジエトフェンカルブは菌の感染前に茎葉散布した場合に 50ppm 以上の濃度で発病を完全に阻止した。また、菌の感染後治療的に茎葉散布した場合においても 12.5ppm 以上の濃度で病斑の進展を強く抑制した (第6表)。さらに第7表に示したように、ジエトフェンカルブの茎葉散布7日後に菌を接種し、残効性をみた場合においても 50ppm 以上の濃度であればその効力は比較的良く保

第6表 ベンズイミダゾール耐性キュウリ灰色かび病に対するジエトフェンカルブの防除効果

濃度 (ppm)	予防効果 (%)	治療効果 (%)
50	100	83.3
12.5	87.5	78.5
3.1	31.3	60.9

第7表 ベンズイミダゾール耐性キュウリ灰色かび病に対するジエトフェンカルブの残効性

濃度 (ppm)	散布処理後日数(日)				
	0	1	3	5	7
200	100	100	100	100	100
50	100	99	100	100	100
12.5	89	76	68	2	0
3.1	41	12	3	0	1

表中の数値は防除効果(%)

持されていた。以上の結果はジエトフェンカルブの持つベンズイミダゾール耐性菌に対する作用特性が、ベンズイミダゾール剤の感受性菌に対する作用特性と比較してほぼ同等であるということを示すものである。病害を効率的に防除するためには一般的に予防的に処理するのが最も効果的であるが、予防効果のみしか示さない薬剤は散布適期を逸した場合、思わぬ被害を受けることがしばしば経験されている。一方、予防、治療効果を有する場合には安定した効果が得られる。さらに、灰色かび病が病斑進展性の病害であるため、治療効果はこの病害の防除剤として好ましい性質となっている。ジエトフェンカルブの治療効果は葉面上から植物体内への薬剤の移行に起因している。ジエトフェンカルブの植物体内への移行性として葉面及び根部からの吸収が認められている(第8表)。

第8表 ベンズイミダゾール耐性キュウリ灰色かび病に対する浸透移行によるジエトフェンカルブの防除効果

処理濃度 (mg/pot)	土壌かん注処理時間(時間)			
	8	24	48	72
5.0	72	83	83	97
1.25	22	75	84	88
0.31	0	77	72	81

表中の数値は防除効果(%)

このような薬剤の移行性は治療効果のみならず、薬剤の付着のない部位などをも病原の攻撃から守るとともに、薬剤散布後の降雨による防除効果の低下を少なくすることにも貢献している⁷⁸⁾。

3. 作用機作

ジエトフェンカルブはベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌の胞子発芽を100ppmの濃度においても阻害しないが、0.05ppm以上の濃度において発芽管の膨潤、湾曲を引き起こした。この特徴的な形態異常はカルベンダジムを処理したベンズイミダゾール感受性菌において認められている。ベンズイミダゾール系殺菌剤がチューブリン蛋白

質に結合し、微小管の重合を阻害することにより、核の分裂を阻害することが知られている。そこで、DAPIによる核の染色を行ったところ、無処理のベンズイミダゾール耐性菌及び感受性株には、膨潤した卵型の核が規則正しく配列しているが、ジエトフェンカルブ処理した耐性菌及びカルベンダジム処理した感受性菌に選択的に核の凝集およびその不均一な分布が観察された。なお、ジエトフェンカルブの菌の代謝に及ぼす影響をみると感受性菌、耐性菌にかかわらず呼吸、DNA、RNA、蛋白質の合成は処理後、4時間で無処理とほぼ同様で特別な変化はみられなかった⁷⁹⁾。以上の結果からジエトフェンカルブの作用機作は耐性菌の有糸分裂を特異的に阻害することであり、このことはカルベンダジムの野生株に対する作用と同一である可能性を示唆している。

さらにジエトフェンカルブとカルベンダジムの負相関交差耐性のメカニズムについてはアカバカンカビを用いて詳細に解析がなされている⁸⁰⁾。ジエトフェンカルブに感受性を示すカルベンダジム耐性株を単離し、その遺伝解析を行ったところ負相関交差耐性は微小管の構成蛋白質である β -チューブリンの変異により起こることが明らかにされた。さらに耐性株の β -チューブリン遺伝子をクローニングし、感受性株の β -チューブリンの198番目のアミノ酸がグルタミン酸であるのに対し、負相関交差耐性を示す耐性株においては、グリシンに置換している。即ちカルベンダジム耐性とジエトフェンカルブ感受性は β -チューブリン蛋白質の1つのアミノ酸の置換によって支配されている。

¹⁴C-ジエトフェンカルブをもちいてジエトフェンカルブ結合蛋白質を検索したところ、ジエトフェンカルブ結合活性は野生株にはほとんど認められず耐性株に特異的に認められた。さらに、このジエトフェンカルブ結合蛋白質は、DEAE Sephadex A-50に保持され、0.5MKClで溶出され、その分子量が約105,000であったことからチューブリンであると推定された。即ち、ジエトフェンカルブは耐性株のチューブリンに特異的に結合することにより耐性株に選択的に抗菌活性を示すと考えられる。

4. 実用化と開発

ジエトフェンカルブはベンズイミダゾール耐性菌に選択的に有効であるという性質上、単剤で使用する場合は、ベンズイミダゾール耐性菌により圧倒的に専有されている圃場でないことが期待される防除効果は望めない。初期に単剤処理により高い防除効果を示したとしてもその後の連続使用により、耐性菌から感受性菌への菌密度のシフトが容易に起こると推測され、感受性菌が優勢となった

第9表 各種ジエトフェンカルブ剤の適用範囲

薬剤 成分 作物	バウミル [®] 水和剤	スミブレンド [®] 水和剤	ゲッター [®] 水和剤	Sumico [®]
	ジエトフェンカルブ 25%	ジエトフェンカルブ 12.5% プロシミドン 37.5%	ジエトフェンカルブ 12.5% チオファネートメチル 52.5%	ジエトフェンカルブ 25% カルベンダジム 25%
キュウリ	灰色かび病	灰色かび病、褐斑病、菌核病		灰色かび病
ナス	〃	灰色かび病、菌核病		〃
トマト	〃	灰色かび病	灰色かび病、菌核病、葉かび病	〃
イチゴ	〃			〃
みかん		灰色かび病	灰色かび病、そうか病	
レタス		灰色かび病、菌核病		
タマネギ		灰色かび病		
インゲンマメ		灰色かび病、菌核病	灰色かび病*	
アズキ			〃	
ブドウ			〃	灰色かび病
ウメ			黒星病*、灰色かび病*	
カキ			灰色かび病*	

* 登録申請中

圃場ではジエトフェンカルブ単剤はもはや十分な防除効果は期待出来ないと考えられる。従って一般に実用場面ではジエトフェンカルブ単剤の使用は困難であり、ベンズイミダゾール系殺菌剤との混合剤としての使用が現実的であると考えられる。

ジエトフェンカルブの実用評価は1984年より日本植物防疫協会の委託試験で開始した。現在までに国内外で評価されているジエトフェンカルブ剤とそれぞれの適用分野については第9表にまとめて示されている。Sumico[®]はカルベンダジムとジエトフェンカルブの混合剤であり、1987年にフランスでブドウの灰色かび病用殺菌剤として販売を開始し、シャンパーニュなど高級ワイン用ブドウ栽培地帯で使用されるようになった。その後、スイスでブドウの灰色かび病に、ギリシャで施設野菜の灰色かび病の防除に使用されるようになり、ベンズイミダゾール耐性菌が問題となっている諸外国での評価は高い。国内ではベンズイミダゾール系殺菌剤であるチオファネートメチルとの混合剤であるゲッター[®]が開発され、海外のSumico[®]同様灰色かび病用殺菌剤として高い評価を得て

いる(第10表、第11表)。

一方、ジエトフェンカルブの混合相手としてプロシミドンが検討され、混合剤スミブレンド[®]として開発された。前述のとおりプロシミドンはジカルボキシイミド系殺菌剤であり、ジエトフェンカルブとは理論的に負相関交差耐性を示さない剤である。にもかかわらず両剤の混合剤であるスミブレンドは実圃場において十分な防除効果を示す。これは以下の理由による。ジカルボキシイミド系殺菌剤としては、イプロジオンが1979年にプロシミ

第10表 Sumico[®]のブドウ灰色かび病防除試験

フランス (1984)		
供試薬剤	処理量 (gai/ha)	健全果率 (%)
ジエトフェンカルブ+カルベンダジム(Sumico [®])	500/500	69.5
ジエトフェンカルブ+プロシミドン	250/500	62.5
ジエトフェンカルブ	250	34.5
プロシミドン	750	22.0
ホルベット+キャプタホル	1600/400	28.0
無処理		24.5

品種：ピノットノイル
散布：7月9日、8月2日、9月6日、9月25日

第11表 ゲッター[®]のカンキツ灰色かび病防除試験

愛媛県立果樹試験場(1987)			
	散布濃度 (ppm)	発病花率 (%)	発病果率 (%)
ジエトフェンカルブ+チオファネートメチル(ゲッター [®])	125/525	1.1	4.1
	83/350	2.2	4.2
有機銅剤+キャプタン	600/400	18.9	19.0
無散布		28.1	27.5

耕種概要：品種 普通温州 30年生
病害発生状況：中発生
散布：落弁初期5月27日に1樹あたり20g散布

ドン、ピンクロズリンが1981年に国内登録を取得し、ベンズイミダゾール系殺菌剤に対する耐性菌が蔓延していた当時広く使用された。しかし、比較的早期にジカルボキシイミド耐性菌が一般圃場より単離されるようになり、現在ではベンズイミダゾールとジカルボキシイミド系殺菌剤に共に耐性を示す複合耐性の灰色かび病菌が出現している。ジカルボキシイミドとベンズイミダゾール系殺菌剤はその作用メカニズムを異にするため基本的には交差耐性は両剤の間には認められない。従って、両剤に対し耐性を示す複合耐性は、ベンズイミダゾール耐性菌の専有率が高い条件で使用され始めたことによると考えられる。ジカルボキシイミド耐性、ベンズイミダゾール耐性とその複合耐性のパターンは理論的には4組あると考えられる。しかし、一般圃場で分離される耐性菌は両耐性菌株、及びベンズイミダゾールにのみ耐性を示す株の割合が高く、ジカルボキシイミドにのみ耐性を示す株の割合が有意に低いことが知られている。このことがジェットフェンカルブとプロシミドンとの混合によるスミブレンド®が圃場において現実的に高い防除効果を示す理由である(第12表)。日本植物防疫協会の依頼試験、特別依頼試験および九州病害虫防除推進協議会の連絡試験などの数多くの試験においてスミブレンド®は施設野菜の灰色かび病に対し、安定した効果を示すことが確認されている。

灰色かび病防除剤の過去の歴史をみると多くの上市剤において比較的早期に耐性菌が発生し、発生後には急速な広がりを見せている。ジェットフェンカルブ剤の今後の最も大きな課題は、耐性菌の発達をいかに抑えるかである。各種試験でスミブレンド®を主体にその散布間隔の検討が実施されているが、3~4週間間隔の散布でも慣行防除に優れるとの試験結果が多い⁸¹⁾。施設栽培果菜類では、作物、作型、地域、気候などによりいくぶん

第12表 スミブレンド®のキュウリ灰色かび病防除試験
日植防研高知試験場(1986)

供試薬剤	散布濃度 (ppm)	発病果率 (%)
ジェットフェンカルブ+プロシミドン(スミブレンド®)	80/250	1.2
	60/190	1.4
イプロジオン	330	21.6
ポリオキシシ AL	200	22.2
無散布		31.6

耕種概要：品種 王金女神2号、播種 10月4日、定植 10月25日
ハウス加温栽培
病害発生状況：1月中旬より発生し、最終調査時は多発生
散 布：1月14日、21日、28日の計3回、300g/ha

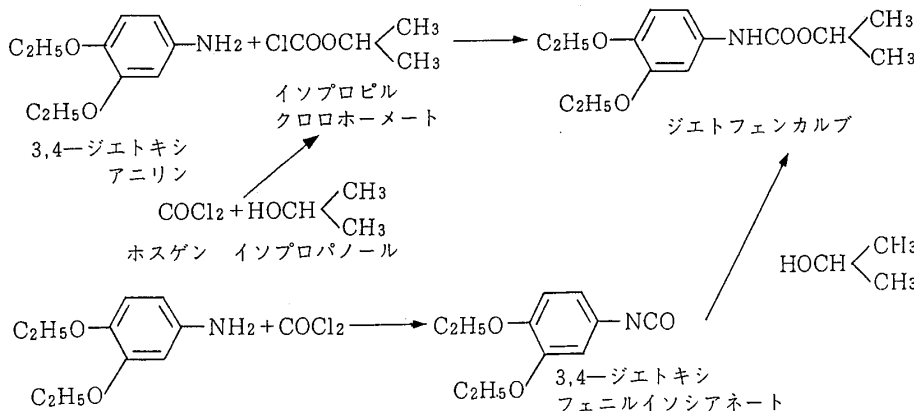
異なるが、約3ヶ月ほどの長期にわたる灰色かび病の発病期間がある。したがって、スミブレンド®が3~4週間という通常の数倍長い散布期間でも有効であることは散布回数を減少させることにつながり、耐性菌抑制には好ましい。さらに、負相関交差耐性を利用したゲッター®、あるいは他剤との体系使用が薬剤耐性を抑える防除方法として適していると考えられる^{81,82)}。

製 造 法

ジェットフェンカルブの合成は、3,4-ジエトキシアニリンとイソプロピルクロロホーマートとを反応するか、3,4-ジエトキシアニリンとホスゲンとの反応により、3,4-ジエトキシフェニルイソシアネートを合成し、これとイソプロパノールとを反応して合成する2つの合成ルートがある。イソプロピルクロロホーマートはイソプロパノールとホスゲンとの反応により合成される。原料中間体の3,4-ジエトキシアニリンはカテコールを原料にエーテル化、ニトロ化、還元を経て合成することが出来る。

1. 3,4-ジエトキシアニリンの合成

カテコールのエーテル化反応はカテコールのアルカ



リ塩とエーテル化剤であるジエチル硫酸あるいはエチルクロライドとの反応により工業的に製造が可能である。

3,4-ジエトキシニトロベンゼンは1,2-ジエトキシベンゼンの濃硝酸によるニトロ化反応ではほぼ定量的に得ることが出来る。

3,4-ジエトキシニトロベンゼンの還元反応による3,4-ジエトキシアニリンの製造は水酸化ソーダあるいは接触還元によりほぼ定量的に得ることが出来る。

2. イソプロピルクロロホーマートの合成

反応としては液化ホスゲンにイソプロピルアルコールを滴下する方法あるいはイソプロピルアルコールにホスゲンを吹き込む方法のいずれにおいても目的とするイソプロピルクロロホーマートをほぼ定量的に得ることが出来る。

3. 3,4-ジエトキシフェニルイソシアネートの合成

反応は3,4-ジエトキシアニリンとホスゲンとの反応で生成した3,4-ジエトキシフェニルイソシアネートとアニリンとの反応によるビス(ジエトキシフェニル)尿素の副生をおさえるためにホスゲン過剰の条件で3,4-ジエトキシアニリンとホスゲンとを反応して*N*-(3,4-ジエトキシフェニル)カルバモイルクロリドを中間体として合成し、この熱分解により3,4-ジエトキシフェニルイソシアネートを合成する。高純度のイソシアネートを得るためには蒸留精製が必要である。

4. ジエトフェンカルブの合成

イソプロピル*N*-(3,4-ジエトキシフェニル)カーバメート(ジエトフェンカルブ)は、3,4-ジエトキシフェニルイソシアネートとイソプロパノールとのトリエチルアミン、ピリジン等の塩基の存在下での反応、または3,4-ジエトキシアニリンとクロロホーマートとの苛性ソーダ、苛性カリ、トリエチルアミン、ピリジン等の脱塩酸剤の存在下での反応によって合成される。

上記の各工程について検討が加えられ、工業的製造法が確定された。

物性、製剤および分析法

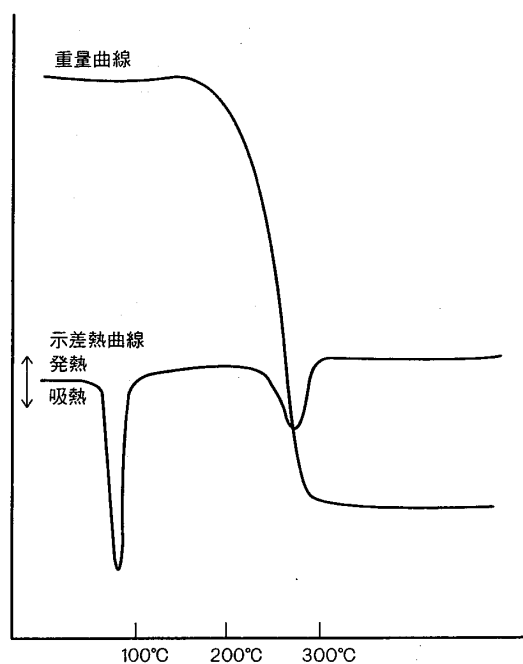
1. 物 性

(1) 物理化学的性質

主な原体物性について第13表に示した。ジエトフェンカルブ原体は融点約100℃、密度1.19の赤紫色結晶である。蒸気圧は20℃で 6.3×10^{-6} mmHgと低い。有機溶剤に対する溶解度は低い方であり、脂肪族系炭化水素、芳香族系炭化水素、アルコール類には20℃で10%

第13表 ジエトフェンカルブ原体の主な物性

項 目	物 性 値
(1) 外 観	赤紫色固体
(2) 密 度	1.19(g/cc) (空気比較式比重計)
(3) 融 点	100.3℃ (日局法)
(4) 蒸 気 圧	20℃ 6.3×10^{-6} mmHg 25℃ 1.1×10^{-4} mmHg
(5) 溶 解 度 (g/l, 20℃)	<溶剤> (溶解度)
	<i>n</i> -ヘキサン 0.8
	キシレン 26
	メタノール 82
	エチルセロソルブ 88
	アセトン 186
	酢酸エチル 119
	アセトニトリル 83
	クロロホルム 435
	ジメチルスルホキシド 392
	ジメチルホルムアミド 381
	水 0.027



第2図 ジエトフェンカルブ原体のDTAダイアグラム

以下しか溶解しない。水に対する溶解度は25℃で27ppmである。

空気雰囲気中での示差熱分析(DTA)ダイアグラムを第2図に示す。顕著な分解ピークは認められず170℃付近から急激な減量が起こる。

(2) 安 定 性

ジエトフェンカルブ原体は熱に対して安定であり、60℃で6カ月保存後もほとんど分解は認められない。ジエトフェンカルブはpHが3~11の水中(20ppm溶液)でも安定であり、14日後の分解率はほぼ5%以下である。

ジェットフェンカルブ原体はホワイトカーボン、けいそう土、クレー、タルク、ベントナイト、炭酸カルシウムなどの各種担体中でもきわめて安定である。

光に対しては315nm以下の短波長で分解が認められるものの分解率はそれほど大きくなく、ジェットフェンカルブ原体の光安定性は比較的良好であると考えられる。

2. 製 剤

ジェットフェンカルブを含有する製剤としてはスミブレンド®水和剤およびゲッター®水和剤が国内で上市されている。スミブレンド®水和剤はジェットフェンカルブを12.5%、プロシミドンを37.5%、ゲッター®水和剤はジェットフェンカルブを12.5%、チオファネートメチルを52.5%含有する混合剤である。スミブレンド®水和剤の主な物性を第14表に示した。水和性、懸垂率等全農規格を満足する良好な物性を有する製剤である。保存安定性も良好であり室温3年、40℃6カ月保存後も有意な含量低下は認められず(第15表)、他の物性にも経時変化は認められない。

また海外ではカルベンダジムとの混合フロアブル剤がSumico®の商品名で販売されている。

第14表 スミブレンド®水和剤の物性

項 目	物 性 値
(1) 外 観・性 状	類白色水和性微粉末
(2) 見掛比重 ゆるめ	0.20 (公定法)
(3) 水 和 性	30秒 (全農法)
(4) 篩試験(-45μm)	99.9%以上 (全農法)
(5) pH	5.2 (全農法)
(6) 懸 垂 率	(全農法)
ジェットフェンカルブ	98%
プロシミドン	99%
(7) 爆 発 性	粉塵爆発下限界 130mg/l

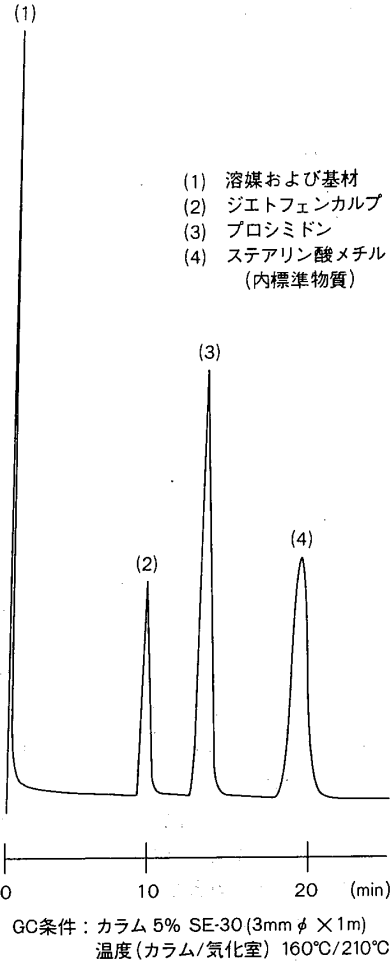
第15表 スミブレンド®水和剤の保存安定性

(着手時を100とした時の残存率, 容器:アルミ箔袋)

保 存 条 件	有 効 成 分 含 量 (%)	
	ジエトフェンカルブ	プロシミドン
着 手 時	100	100
室 温 3 年	100	100
40℃ 6 ヶ月	100	100

3. 分 析 法

スミブレンド®水和剤中のジェットフェンカルブはカラムに5%SE-30、内標準物質にステアリン酸メチルを用いたGC-IS法で正確に精度よくプロシミドンと同時分析できる(第3図)。



第3図 スミブレンド®水和剤のガスクロマトグラム

代謝・残留・毒性

1. 動物、植物および土壌における代謝、分解、残留

(1) 哺乳動物における代謝

フェニル環を¹⁴Cで標識したジェットフェンカルブ(¹⁴C-フェニル-ジェットフェンカルブ)を雌雄ラットに経口投与して代謝を調べた。10mg/kgあるいは300mg/kgの割合で1回経口投与すると、投与した放射能のほとんどは投与後48時間以内に尿および糞中に回収された。投与後7日間の¹⁴C回収率は投与量の99~100%であった。投与した放射能の80~88%が尿中に排泄された。血中および各種組織中の¹⁴C濃度は投与後0.5時間以内に最高値に達し、その後速やかに減少した。また、¹⁴C組織残留は低かった。ジェットフェンカルブの尿中の主要代謝物は4-エトキシ基の脱エチル体(4-OH-DFC)

の硫酸抱合体であり、ジエトフェンカルブの主要代謝反応は、1) 4-エトキシ基の脱エチル化、2) カバメート結合の開裂、3) アミノ基のアセチル化、および4) 上記の反応で生成したフェノールと硫酸あるいはグルクロン酸との抱合化であった(第4図)。あらかじめ非標識ジエトフェンカルブを10mg/kg/dayの割合で14日間連続投与しても、¹⁴C標識体の代謝に顕著な変化は認められなかった。また、どの投与群においても代謝に顕著な性差は認められなかった(住友化学, 1989)。

(2) 植物における代謝

¹⁴C-フェニルジエトフェンカルブをキュウリの小さな果実に表面塗布した後、経時的にキュウリを収穫し、¹⁴Cの分布および代謝について調べた。処理14日後に回収された¹⁴Cは処理量の90~94%であり、そのうち75%が果実表面に、15~19%が内部に存在していた。主残留物はジエトフェンカルブであり、処理14日後に処理量の76~80%残存していた。他に代謝物として3-あるいは4-エトキシ基の脱エチル体(3-OH-DFC, 4-OH-DFC)およびイソプロピル基メチルの酸化

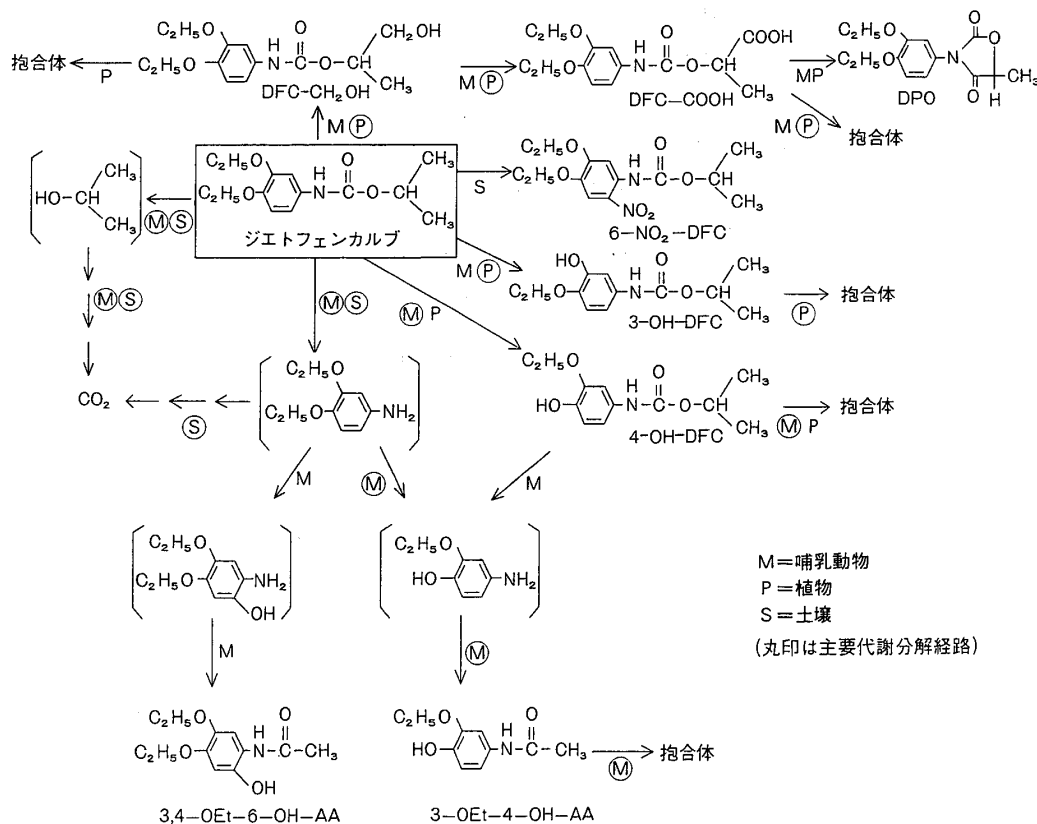
体(DFC-CH₂OH, DFC-COOH)のそれぞれ抱合体が検出された(住友化学, 1988)。

またキュウリおよびブドウの葉表面に¹⁴C-フェニルジエトフェンカルブあるいはイソプロピル基のメチル炭素を¹⁴Cで標識したジエトフェンカルブ(¹⁴C-イソプロピルジエトフェンカルブ)を塗布した後、同様に¹⁴Cの分布および代謝を調べた。葉に処理されたジエトフェンカルブは揮散および代謝により消失し、その半減期はキュウリで約9日、ブドウで約34日であった。処理葉から他の植物体部分への移行は極めてわずか(2~3%以下)であった。主要代謝物は果実へ処理した場合と同様エトキシ基の脱エチル体およびイソプロピル基メチルの酸化体でいずれも抱合体として存在した(住友化学, 1986)。これら作物中で検出された代謝物はすべて哺乳動物の代謝経路に含まれるものばかりであった。

(3) 土壌における挙動

① 土壌中での代謝分解

好気的畑地条件下25±2°Cの暗所でプレインキュベーションした土壌に¹⁴C-フェニルジエトフェンカルブ



第4図 ジエトフェンカルブの予想代謝分解経路

あるいは¹⁴C-イソプロピル-ジエトフェンカルブを0.5ppmとなるように添加した後、再び同様の条件下にもどし発生する炭酸ガスおよび揮散性物質を捕集しながらインキュベートし、分解速度および経路について調べた。

ジエトフェンカルブは好氣的畑地条件下の土壤中で迅速に分解し、その消失半減期は2種類の土壤で1日以下～6日であった。一方嫌氣的畑地条件下ではジエトフェンカルブの分解は非常に遅くなり、滅菌畑地条件下ではほとんど分解が認められなかった。この事より、分解は主に好気性土壤微生物によって起こるものと思われる。ジエトフェンカルブはカーバメート結合の開裂を経て分解されるが、加水分解物は検出されず標識した炭素は速やかに炭酸ガスにまで代謝された。放射性炭酸ガスの発生量は処理270日後にはフェニル標識体で処理量の31～57%、イソプロピル標識体で44～48%に達した。他にフェニル基の6位がニトロ化された化合物(6-ニトロジエトフェンカルブ, 6-NO₂-DFC)が1種類の土壤中で数%生成したが、経時的に蓄積する傾向は認められなかった(住友化学, 1988)。

また、6-NO₂-DFCの作物への吸収移行試験の結果(住友化学, 1988)から、土壤中で生成した6-NO₂-DFCが作物を経由してヒトに摂取される可能性はほとんどないことがわかった。

②圃場での土壤残留

実際の畑地での圃場土壤残留試験ではジエトフェンカルブの消失半減期は16～25日であった(住友化学, 1988)。また6-NO₂-DFCの残留量も同時に分析したが、その残留値は最高でも0.024ppmと微量であった(住友化学, 1988)。

③土壤における溶脱

性質の異なる4種類の土壤をガラスカラム(内径3cm)に30cmの深さに均等に充填し、その上に¹⁴C-フェニル

-ジエトフェンカルブを乾土あたり0.5ppmの割合で処理した土壤を添加し、蒸留水350mlを2ml/hrの流速で滴下した。これは、日本の年間降水量の25～50%を約1週間という短期間に流したことに相当する。

有機物含量が1.6～11.6%の土壤では添加した¹⁴Cはほとんど土壤カラム中の処理部位およびその下0～6cmの部位にとどまり、流出液中に認められる¹⁴Cは処理量の1%以下であった。一方有機物をほとんど含まない砂土(有機物含量0.1%)からは添加した¹⁴Cの大半が流出した(住友化学, 1988)。この事より、ジエトフェンカルブは土壤中の有機物に強く吸着されるため、通常の農耕地等では溶脱を起こす可能性は少ないと考えられる。

(4) 水棲生物に対する影響

ジエトフェンカルブのコイに対する毒性は弱く、原体の48時間LC₅₀値は13.5mg/l(住友化学, 1984)、製剤であるパウミル25%水和剤の48時間LC₅₀値は93.0mg/lであった(住友化学, 1989)。またミジンコに対しても毒性は弱く、原体の3時間LC₅₀値は10mg/l以上(住友化学, 1988)、製剤であるパウミル25%水和剤の3時間LC₅₀値は1000mg/l以上であった(住友化学, 1989)。従ってジエトフェンカルブの魚毒性は通常の使用方法で問題ないとされているA類に分類される。またジエトフェンカルブは畑作物に用いられるため、水田用の農薬と異なり直接水系に入ることは少ない。これらの事からジエトフェンカルブの水棲生物に及ぼす影響は実際上ないと考えられる。

2. 哺乳動物に対する毒性

(1) 急性毒性

ジエトフェンカルブのラットおよびマウスに対する急性毒性を第16表に示した。

ジエトフェンカルブを0.5%メチルセルロースに懸濁

し、経口もしくは経皮投与してラットおよびマウスに対する急性毒性を調べた。いずれの場合も5,000mg/kgまで死亡を認めなかった。経皮投与では毒性症状を認めず、経口投与では自発運動減少、歩行失調、四肢麻痺、筋攣縮、流涎、尿失禁、呼吸不規則、立毛が観察された(住友化学, 1985)。また、ジエトフェンカルブの急性吸入毒性試験では、1,050mg/m³(噴射可能最大量)の気中濃度でダストエアゾールをラットに4時間全身曝露した。曝露群では、鼻汁分泌、流涎が認められ

第16表 ジエトフェンカルブおよび製剤のラット、マウスに対する急性毒性

剤型	動物種	投与経路	LD ₅₀ (mg/kg)		溶媒
			雄	雌	
原体	ラット	経口	>5,000	>5,000	0.5%MC ^{a)}
		経皮	>5,000	>5,000	0.5%MC
	マウス	吸入	>1,050 ^{b)}	>1,050 ^{b)}	Tokusil GU-N
		経口	>5,000	>5,000	0.5%MC
パウミル25%水和剤	ラット	経口	>5,000	>5,000	精製水
		経皮	>2,000	>2,000	精製水
	マウス	吸入	>647 ^{b)}	>647 ^{b)}	精製水
		経口	>5,000	>5,000	精製水

a) 0.5%メチルセルロース水溶液

b) LC₅₀ (mg/ml)

たが、曝露終了1時間以内に回復し、死亡はみられなかった。体重、肉眼的病理検査および呼吸器系器官に対する病理組織学的検査においてジエトフェンカルブの曝露に起因する変化は認められなかった（住友化学、1986）。

一方、パウミル25%水和剤を5,000mg/kgの用量でラットおよびマウスに経口投与したところ自発運動減少、立毛、円背位、よるめき歩行などの症状を認めたが、死亡を認めなかった（Huntingdon Research Centre (HRC), 1987; 住友化学, 1989)。また、2,000mg/kgをラットに経皮投与しても毒性症状の発現および死亡を認めなかった（HRC, 1987）。ラットでの急性吸入毒性試験では、パウミル25%水和剤を精製水で希釈し、ミストエアゾルとして176mg/m³と647mg/m³（噴射可能最大量）の気中濃度で4時間全身曝露した。高濃度曝露群で呼吸不規則、流涎がみられたが、曝露終了1時間以内に回復し、死亡は認められなかった。体重、肉眼的病理検査および呼吸器系器官に対する病理組織学的検査において本水和剤の曝露に起因する変化は認められなかった（住友化学, 1991）。

(2) 亜急性毒性試験

ジエトフェンカルブのラットおよびイヌを用いた亜急性毒性試験の概要を第17表に示した。ラットの3カ月間亜急性毒性試験では、雄の3,000ppm以上の群および雌の10,000ppm群で体重の低値、10,000ppm群の雌雄で摂餌量・摂水量の低値が認められた。尿検査において、ウロビリノーゲンの減少が雄の3,000ppm以上の群で、タンバクの減少が雄の10,000ppm群で、尿pHの上昇が雌の10,000ppm群で認められた。血液学的検査では、雌雄とも10,000ppm群で赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少がみられ、また、雄の10,000ppm群で血小板数の増加が認められた。血液生化学的検査では、10,000ppm群の雌雄でアルブミン、リン脂質、コレステロールの増加が見られ、雌の10,000ppm群で総タンバクの増加と雌の3,000ppm群でコレステロールの増加が認められた。また、雄の10,000ppm群で血糖およびクロ

ールの減少、雌の10,000ppm群でカルシウムの増加が認められた。肉眼的病理検査では、雄の3,000ppm以上の群および雌の10,000ppm群で肝臓重量の増加、また、雄の3,000ppm以上の群で精巣重量の増加がみられた。病理組織学的検査では雄の3,000ppm以上の群および雌の10,000ppm群で小葉中心性の肝細胞の肥大が認められ、電子顕微鏡による検査では肝細胞の滑面小胞体の増生が認められた。以上の結果から、本試験における無影響量は1,000ppm（雄：78.2mg/kg/日、雌：90.8mg/kg/日）であった（住友化学, 1986）。また、ビーグル犬における3カ月間亜急性毒性試験では、300mg/kg投与群において嘔吐頻度の増加（雌雄）、体重の軽度な減少もしくは体重増加の抑制（雌）、アルブミンの低値（雄）、アルカリホスファターゼ活性の高値（雌）が認められた。肉眼的病理検査では300mg/kg投与群で肝臓重量の増加（雌雄）が認められたが、病理組織学的検査では異常は認められなかった。100mg/kg以下の投与群では化合物投与によると考えられる変化は認められず、無影響量は100mg/kg/日であった（Hazleton Laboratories America (HLA), 1986）。

(3) 慢性毒性・発癌性

ジエトフェンカルブの慢性毒性および発癌性試験の方法および結果の要約を第18表に示した。

SD系ラットにおける24カ月間慢性毒性・発癌性試験では、雌雄とも5,000ppm投与群において体重増加の抑制がわずかに認められた。血液生化学的検査では5,000ppm群の雌で総コレステロール値の上昇が認められた。肉眼的病理検査において5,000ppm群のみで肝臓重量の増加がみられた。病理組織学的検査においては5,000ppm群において甲状腺腫のわずかな増加が認められたが、1,000ppm以下の投与群においてはその増加を認めなかった。本試験における無影響量は1,000ppm（雄：42.7mg/kg/日、雌：54.5mg/kg/日）であった（HLA, 1989）。

ICR系マウスにおける18カ月間発癌性試験では、10,000ppm群の雄で死亡率が上昇し、また、10,000ppm群の雌においては肝臓重量の高値を示した。病理組織学

第17表 ジエトフェンカルブの亜急性毒性試験^{a)}

試験	動物	動物数	投与方法	投与量	最大無作用量	主要所見
3ヵ月 亜急性	SDラット	雌雄 各15匹	飼料混入	0, 300, 1,000, 3,000, 10,000ppm	♂♀ 1,000ppm	体重増加抑制、摂餌量・摂水量減少 軽度の貧血傾向、肝臓重量増加、 肝細胞の肥大・滑面小胞体の増生
3ヵ月 亜急性	ビーグル犬	雌雄 各4匹	経口 (カプセル)	0, 10, 30, 100, 300mg/kg	♂♀ 100mg/kg	嘔吐、軽度な体重増加抑制 肝臓重量の軽度な増加

a) 主な検査項目：臨床観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科検査、臓器重量、肉眼的および病理組織学的検査

第18表 ジェトフェンカルブの慢性毒性・発癌性試験^{a)}

試験	投与期間	動物	動物数	投与方法	投与量	最大無作用量	主要所見
慢性・発癌	24ヵ月	SDラット	雌雄各50匹/主群 各30匹/副群	飼料混入	0, 40, 200, 1,000, 5,000ppm	1,000ppm	体重増加抑制, 肝臓重量の増加, 甲状腺腫瘍の増加
発癌	18ヵ月	ICRマウス	雌雄各50匹/主群 各30匹/副群	飼料混入	0, 10, 100, 1,000, 10,000ppm	1,000ppm	肝臓重量の増加 肝細胞過形成
慢性	12ヵ月	ビーグル犬	雌雄各6匹	経口 (カプセル)	0, 10, 50, 250, 1,000mg/kg	50mg/kg	体重増加抑制 赤血球系パラメータの低値 肝臓重量の増加, 肝細胞の肥大 肝細胞色素沈着

a) 主な検査項目: 臨床観察, 体重, 摂餌量, 血液学的検査, 血液生化学的検査(マウス発癌性試験は除く), 尿検査, 眼科検査, 臓器重量, 肉眼的および病理組織学的検査

的検査では, 高用量群において肝細胞過形成が認められた。本試験においてジェトフェンカルブに発癌性は認められず, 無影響量は1,000ppm(雄: 164mg/kg/日, 雌: 203mg/kg/日)であった(HLA, 1988)。

ビーグル犬における12ヵ月間の慢性毒性試験では, 死亡例はなく, 雄の250mg/kg以上の投与群では摂餌量の減少および体重増加抑制が認められ, 雌では1,000mg/kg投与群で体重増加抑制が認められた。また, 雌雄とも1,000mg/kg群では, 自発運動減少, るい瘦, 流涎が認められた。血液学的検査では, 1,000mg/kg投与群の雄と250mg/kg以上の雌の投与群で赤血球数, ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の軽度な減少がみられた。血液生化学的検査では, 雌雄ともアルカリホスファターゼ活性の上昇が250mg/kg以上の投与群で認められた。雌雄とも250mg/kg以上の投与群に肝臓重量の増加が認められ, 肉眼的病理検査では肝臓の暗色化が認められた。また, 病理組織学検査では250mg/kg以上の投与群で肝細胞内に褐色色素の沈着が観察され, 雌雄とも1,000mg/kg投与群では肝細胞の軽度な肥大が認められた。これらの他に, 1,000mg/kg投与群で脾臓重量の対重量比のみに増加が認められたが病理組織学的検査では

異常は認められなかった。これらの結果から無影響量は50mg/kg/日であった(HLA, 1989)。

(4) 変異原性

細菌を用いた復帰変異試験およびDNA修復試験, チャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞(CHO-K1)を用いた染色体異常試験および姉妹染色分体交換試験(SCE), チャイニーズハムスター肺由来のV79細胞を用いた遺伝子突然変異性試験, ラット肝初代培養細胞を用いた不定期DNA合成(UDS)試験, マウスを用いた小核試験を実施した。いずれの試験においてもジェトフェンカルブに変異原性は認められなかった(第19表)(住友化学, 1986, 1987, 1989; HLA, 1989)。

(5) 刺激性および皮膚感作性

第20表に示したように, ジェトフェンカルブはウサギの眼に対して極く軽度の刺激性を示したが, 皮膚に対する刺激性は認められなかった。また, モルモットに対して皮膚感作性を示さなかった(住友化学, 1985)。パウミル25%水和剤はウサギの眼に対して軽度の刺激性を示し, 皮膚に対しても極く軽度の刺激性を示したが, いずれも一過性であった(HRC, 1987)。また, モルモットに対して皮膚感作性を示さなかった(住友化学,

第19表 ジェトフェンカルブの変異原性試験

試験	試験系	試験条件	結果
復帰変異	サルモネラ菌, 大腸菌	50-2,000μg/plate (S9mix存在下および非存在下)	陰性
遺伝子突然変異	チャイニーズハムスター培養細胞(V79)	20-200μg/ml (S9mix存在下および非存在下)	陰性
染色体異常	チャイニーズハムスター培養細胞(CHO-K1)	0.05-0.5mM (S9mix非存在下) 0.1-1mM (S9mix存在下)	陰性
小核試験	マウス(骨髓細胞)	1250, 2500, 5,000mg/kg 腹腔内投与	陰性
DNA修復	枯草菌 M45/H17株	100-5,000μg/ディスク (S9mix存在下および非存在下)	陰性
姉妹染色分体交換	チャイニーズハムスター培養細胞(CHO-K1)	0.1-1mM (S9mix存在下および非存在下)	陰性
不定期DNA合成	ラット初代培養肝細胞	0.005-203μg/ml	陰性

第20表 ジェトフェンカルブおよび製剤の刺激性，アレルギー性試験

剤型	試験	動物	試験条件	結果
原体	眼刺激性	ウサギ	0.1g/眼	極く軽度の刺激性 刺激性なし 皮膚感受性なし
	皮膚刺激性	ウサギ	0.5g/部位	
	皮膚感受性	モルモット	Buehler法 感作：0.5g/匹×10回（貼付） 惹起：0.5g/匹（貼付）	
パウミル 25%水和剤	眼刺激性	ウサギ	0.1ml（27mg原体相当）/眼	軽度の刺激性 極く軽度の刺激性 皮膚感受性なし
	皮膚刺激性	ウサギ	0.5g/匹	
	皮膚感受性	モルモット	Maximization法 一次感作：0.5%検体 （皮内） 二次感作：25%ワセリン軟膏（0.4g） （経皮） 惹起：25%ワセリン軟膏（貼付）	

第21表 ジェトフェンカルブの次世代に及ぼす影響試験

試験	動物種	動物数	投与方法	投与量	投与期間	結果
催奇形性 ^{a)}	SDラット	25匹/群	経口	0, 100, 300, 1,000mg/kg	妊娠6—15日	催奇形 性なし
	ウサギ (New Zealand White)	16匹/群	経口	0, 125, 300, 750mg/kg	妊娠7—19日	催奇形 性なし
繁殖性 ^{b)}	SDラット	雌雄 各26匹/群	飼料 混入	0, 200, 1,000, 5,000ppm	F0: 8週齢から F1: F1雌乳から F2: F2雌乳まで	繁殖性 に影響 なし

主な検査項目

- a) 親動物：臨床観察，体重，摂餌量，黄体数，着床率，胎子数，妊娠率，死亡胚・仔数
仔動物：体重，体長，性比，外形・骨格・内臓検査
b) 親動物：臨床観察，体重，摂餌量，妊娠率，妊娠期間，肉眼的および病理組織学的検査
仔動物：臨床観察，出生子数，性比，体重，肉眼的および病理組織学的検査

1988)。

(6) 次世代に及ぼす影響

催奇形性および繁殖性試験の要約を第21表に示した。ラットを用いた催奇形性試験では，0, 100, 300, 1,000mg/kg/日の投与量で妊娠6日から15日までの10日間経口投与した。1,000mg/kg/日の投与量において，母獣の体重増加量および摂餌量の低値が認められたが胚・仔致死作用および催奇形作用は認められなかった。これらの結果から，母獣に対する無影響量は300mg/kgで，胎仔に対する無影響量は1,000mg/kgであった（HLA, 1987）。ウサギを用いた催奇形性試験では，0, 125, 300, 750mg/kg/日の投与量で妊娠7日から19日までの13日間経口投与した。750mg/kg/日の投与量において胚・仔死亡率の上昇傾向がみれたが，催奇形作用は認められなかった。これらの結果から，母獣に対する無影響量は750mg/kgで，胎仔に対する無影響量は300mg/kgであった（HLA, 1987）。

また，ジェトフェンカルブを飼料中に0, 200, 1,000, 5,000ppmの濃度で混入し，2世代にわたってラットに毎日摂食させ繁殖性に対する影響を検討した。成育期にお

いて体重の増加抑制が5,000ppm群の親世代とF₁世代および1,000ppm群の親世代の雄とF₁世代の雌に認められた。また，5,000ppm群では両世代とも肝臓の相対重量増加が認められたが病理組織学的な変化はなかった。妊娠率，妊娠期間，出産，出生子の生存率や性比などに両世代とも影響はなかった。5,000ppm群のF₂世代の子において，出生時の体重は対照群と同等であったが授乳期間中の体重は軽度な低値を示した。これらの結果から，繁殖性に対する無影響量は5,000ppmであった（HLA, 1988）。

(7) 生体の機能に及ぼす影響

ジェトフェンカルブ原体の一般薬理試験において，マウスに対して高用量（1,000mg/kg以上）の経口投与によって振戦，痙攣，運動性の低下などの症状を示し，ウサギに対する静脈内投与によって軽度な血圧低下（1mg/kg以上），前脛骨筋収縮の軽微な増加（10mg/kg以上）などの変化を示した。また，摘出臓器については高用量においてモルモットの摘出回腸（3μg/ml以上），輸精管（30μg/ml以上）で非特異的作用を示した（東京農工大，1989）。

以上の結果からジエトフェンカルブの毒性をまとめると、急性毒性は弱く、眼に対して極く軽度の刺激性を示すが、皮膚に対する刺激性は認められない。また、皮膚感作性、変異原性はなく、次世代に対する影響（催奇形性、繁殖性）も認められない。ラット、マウス、イヌを用いた亜急性あるいは慢性毒性試験の結果から、影響の認められる主要臓器は肝臓であると考えられる。いずれの動物種においても高用量群で肝臓重量の増加が認められ、病理組織学的にはマウスで肝細胞の過形成、イヌでは肝細胞の肥大などが認められた。しかしながら、肝臓に対して発癌性を示唆する所見は認められなかった。ラットを用いた慢性毒性・発癌性試験において最高用量の5,000ppm群でバックグランド値をわずかに上回る甲状腺腫瘍の増加がみられた。しかし、ジエトフェンカルブに変異原性は認められず、ラットでの甲状腺腫瘍の増加はDNAおよび染色体に対する直接的な影響に基づくのではないことが示唆された。一方、ラットでは他の実験動物と比較して甲状腺-脳下垂体系のホルモンの不均衡による二次的な甲状腺腫瘍の誘導が起こりやすいことが知られている⁸³⁻⁸⁵⁾。事実、ジエトフェンカルブの標的臓器が肝臓であり、肝細胞の滑面小胞体の増生が認められていることに加えて、本化合物によって肝臓のT₄代謝機能の昂進が認められ、それによりホルモン系の不均衡（T₄減少、TSH上昇）が誘発されていることが確認されている（住友化学、1989）。これらのことから、本甲状腺腫瘍は甲状腺-脳下垂体系ホルモンの不均衡による二次的な甲状腺腫瘍の誘導であり、閾値を想定できる作用であることが強く示唆される。マウスを用いた発癌性試験では甲状腺も含めていずれの臓器、組織においても腫瘍の増加は認められていない。また、イヌの長期毒性試験においても甲状腺に対する影響は認められていない。ヒトでの疫学調査では、甲状腺の機能昂進と甲状腺発癌との相関は認められず、甲状腺ホルモンの不均衡を介した癌の発生に対するヒトの感受性は極めて低いと考えられている⁸⁶⁾。したがって、ジエトフェンカルブの甲状腺に対する影響はラットに特異的なものであり、ヒトへの発癌性の可能性はないと考えられる。

なお、日本においては平成2年11月に登録が取得され、適用作物の残留基準値は果実、野菜に対しては5ppm、豆類には0.1ppmが設定されている。

引用文献

- 1) K.J. Bent, A.M. Cole, J.A.W. Turner & M. Woolner : "Proc. 6th Brit. Insectic Fungic. Conf. Brighton", 1, 274 (1971)
- 2) S.G. Georgopoulos : "Antifungal Compounds, Vol.II"

- ed. by M.R. Siegel & H.D. Sisler, Marcel Dekker, Inc., New York, 439 (1977)
- 3) E.G. Ruppel : *Phytopathology*, 65, 785 (1975)
- 4) J. Dekker : "Systemic Fungicides" ed. by R.W. Marsh, Longman Group Limited, London (1977)
- 5) 上杉康彦 : 「農薬-デザインと開発指針」, ソフトサイエンス社, 725 (1979)
- 6) 上杉康彦 : 「薬剤抵抗性-新しい農薬開発と総合防除の指針」, ソフトサイエンス社, 317 (1983)
- 7) M.A. De Waard : *Proc. Brit. Crop Protec. Conf.* 2, 573 (1984)
- 8) 山本 啓 : *植物防疫*, 29, 194 (1975)
- 9) 塚信夫, 木曾 皓 : *日植病報*, 42, 98 (1976)
- 10) 深谷雅子, 加藤作美, 佐藤 廣 : *秋田果試研報*, 11, 33 (1979)
- 11) 竹内妙子, 長井雄治 : *日植病報*, 48, 210 (1982)
- 12) P. Leroux & M. Gredt : *C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D.* 289 691 (1979)
- 13) P. Leroux & M. Gredt : *Phytiatr. Phytopharm.* 28, 79 (1979)
- 14) T. Kato, K. Suzuki, J. Takahashi & K. Kamoshita : *J. Pesticide Sci.* 9, 489 (1984)
- 15) 住友化学 特公昭58-39802
- 16) 住友化学 特公昭58-55140
- 17) 住友化学 特公昭60-43041
- 18) 住友化学 特公平 2-39503
- 19) 住友化学 特開昭57-171951
- 20) 住友化学 特開昭58-41804
- 21) 住友化学 特開昭58-41805
- 22) 住友化学 特開昭58-43907
- 23) 住友化学 特開昭58-79968
- 24) 住友化学 特開昭58-103354
- 25) 住友化学 特開昭58-126856
- 26) 住友化学 特開昭58-192806
- 27) 住友化学 特開昭58-192858
- 28) 住友化学 特開昭58-192859
- 29) 住友化学 特開昭58-192861
- 30) 住友化学 特開昭58-208261
- 31) 住友化学 特開昭59-42307
- 32) 住友化学 特開昭59-42308
- 33) 住友化学 特開昭59-46259
- 34) 住友化学 特開昭59-51208
- 35) 住友化学 特開昭59-51258
- 36) 住友化学 特開昭59-70649
- 37) 住友化学 特開昭59-70651
- 38) 住友化学 特開昭59-73506
- 39) 住友化学 特開昭59-73564
- 40) 住友化学 特開昭59-84804
- 41) 住友化学 特開昭59-130202
- 42) 住友化学 特開昭59-130242
- 43) 住友化学 特開昭59-155301
- 44) 住友化学 特開昭59-161301
- 45) 住友化学 特開昭59-161342
- 46) 住友化学 特開昭59-167556
- 47) 住友化学 特開昭59-176237
- 48) 住友化学 特開昭59-184110
- 49) 住友化学 特開昭59-184150
- 50) 住友化学 特開昭59-204165

- 51) 住友化学 特開昭59-205354
 52) 住友化学 特開昭59-210004
 53) 住友化学 特開昭59-210053
 54) 住友化学 特開昭59-210059
 55) 住友化学 特開昭59-210064
 56) 住友化学 特開昭59-212410
 57) 住友化学 特開昭59-212461
 58) 住友化学 特開昭59-216855
 59) 住友化学 特開昭59-216864
 60) 住友化学 特開昭59-225102
 61) 住友化学 特開昭59-231005
 62) 住友化学 特開昭60-1157
 63) 住友化学 特開昭60-1159
 64) 住友化学 特開昭60-61556
 65) 住友化学 特開昭60-67455
 66) 住友化学 特開昭61-17555
 67) 住友化学 特開昭61-165308
 68) 住友化学 特開昭61-171462
 69) 住友化学 特開昭61-176566
 70) 住友化学 特開昭61-180703
 71) 住友化学 特開昭61-289066
 72) 住友化学 特開昭61-289072
 73) 住友化学 特開昭62-10049
 74) 住友化学 特開平 2-300104
 75) J. Takahashi, S. Nakamura, H. Noguchi, T. Kato & K. Kamoshita : J. Pesticide Sci. 13, 63 (1988)
 76) J. Takahashi, O. Kirino, C. Takayama, S. Nakamura, H. Noguchi, T. Kato & K. Kamoshita, Pestic. Biochem. Physiol. 30, 262 (1988)
 77) J. Takahashi, O. Kirino, C. Takayama, S. Nakamura, H. Noguchi, T. Kato & K. Kamoshita : J. Pesticide Sci. 13, 587 (1988)
 78) 久田芳夫, 藤村 真, 植物防疫, 43 (11), 590 (1989)
 79) S. Nakamura, T. Kato, H. Noguchi, J. Takahashi & K. Kamoshita : Abstracts 6th Int. Congr. Pestic. Chem. Ottawa, Canada E-01 (1986)
 80) M. Fujimura, K. Oeda, H. Inoue & T. Kato : ACS symposium series, 421, 224 (1990)
 81) スミブレンド®水和剤 : スミブレンド普及会 (1990)
 82) ゲッター®水和剤 : ゲッター普及会 (1990)
 83) C.K. Atterwill & C.G. Brown : Arch. Toxicol., Supple. 12, 71 (1988)
 84) O.E. Paynter, G.J. Burin, R.B. Jaeger & C.A. Gregorio : Regulatory Toxicology and Pharmacology, 8, 102 (1988)
 85) 宮本純之, 渡辺知幸, 奥野泰由, 小木曾重文, 細川俊治 : 日本農薬学会誌, 13, 295 (1988)
 86) R.N. Hill, L.S. Erdreich, O.E. Paynter, P.A. Roberts, S.L. Rosenthal & C.F. Wilkinson, Fundamental and Applied Toxicology, 12, 629 (1989)